

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr

EINE NEUE MÖGLICHKEIT DER "NON-PARENTERAL"
(LOKALEN) IMPFUNG: DIE IMMUNISIERUNG ÜBER
DIE WUNDE AM MODELL "TETANUS-MAUS"

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Hermann Meiler
aus
Lippertsgrün

München 1976

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr
Korreferent: Prof. Dr. E. Munz

Tag der Promotion: 30. Juli 1976



DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

I=N H=A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. <u>EINLEITUNG</u>	1
2. <u>SCHRIFTTUM</u>	2
2.1. <u>Überblick über die wichtigsten lo-</u> <u>kalen Impfmethode</u>	2
2.2. <u>Lokale Impfverfahren zur Bekämpfung</u> <u>bakterieller Erkrankungen</u>	2
2.2.1. Grundlagen	3
2.2.2. Impfstoffe zur oralen Immunisierung	3
2.2.2.1. Lebendimpfstoffe	4
2.2.2.1.1. Impfstoffe aus Bakterienstämmen mit geringem Wachstum im Wirt	4
2.2.2.1.1.1. Biochemische Mangelmutanten	4
2.2.2.1.1.2. Streptomycinabhängige Mutanten(Sm-d)	4
2.2.2.1.1.3. Temperaturempfindliche Mutanten	5
2.2.2.1.1.4. Dwarf colony-Mutanten	6
2.2.2.1.1.5. Interspezies-Hybriden	7
2.2.2.1.2. Impfstoffe aus Bakterienstämmen mit Verlust bzw. Verminderung des soma- tischen Antigens	7
2.2.2.1.3. Impfstoffe aus Bakterienstämmen mit geringer oder veränderter Toxinpro- duktion	8
2.2.2.1.4. Impfstoffe aus "Feldstämmen"	9
2.2.2.2. Impfstoffe aus inaktivierten Bak- terien oder ihren Antigenen	11
2.2.2.2.1. Impfstoffe aus inaktivierten Bakterien	11

	Seite
2.2.2.2.1.1. Inaktivierung mit physikalischen Verfahren	11
2.2.2.2.1.2. Inaktivierung mit chemischen Verfahren	12
2.2.2.2.2. Impfstoffe aus Bakterienextrakten oder -fraktionen	13
2.2.2.2.3. Impfstoffe aus Bakterientoxoiden oder -toxinen	14
2.2.2.3. Adjuvantien bei Oralvakzinen	16
3. <u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	18
3.1. <u>Material und Methoden</u>	18
3.1.1. Versuchstiere	18
3.1.2. Impfstoff	18
3.1.3. Immunisierung	18
3.1.4. Wundsetzung	19
3.1.5. Belastungsversuche	19
3.1.6. Auswertung der Belastungsversuche	19
3.2. <u>Ergebnisse</u>	21
3.2.1. Wundimmunisierung mit Cl. tetani-Toxoid	21
3.2.1.1. Einfluß der Antigenkonzentration auf die Immunität	21
3.2.1.2. Einfluß des Immunisierungszeitpunktes nach der Wundsetzung auf die Immunität	21
3.2.1.3. Einfluß der Wundart auf die Immunität	22
3.2.1.4. Einfluß der Wundgröße auf die Immunität	23
3.2.1.5. Einfluß der Wundversorgung auf die Immunität	23
3.2.1.6. Zeitliche Entwicklung der Immunitätsbildung	23
3.2.1.7. Einfluß einer oftmaligen Immunisierung in kurzen Zeitabständen auf die Immunität	24

	Seite
3.2.1.8. Einfluß der Wundimmunisierung auf die Wundheilung	25
3.2.2. Wundimmunisierung mit Cl. novyi-Toxoid	25
4. <u>BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE</u>	34
5. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	36
6. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	38

1. E I N L E I T U N G

Eine aktive Immunisierung über die Wunde ist bisher nicht beschrieben worden. Eine Wundimmunisierung bietet sich jedoch aus verschiedenen Gründen an. Möglicherweise werden hierfür nicht mehr Antigenmengen als bei der parenteralen Schutzimpfung benötigt. Zum anderen würde eine Wundimmunisierung eine ganze Reihe weiterer Vorteile bringen. Die wichtigsten sind: schnelle Immunisierung und dadurch rascher Eintritt der Immunität, Vermeidung des Injektionsschmerzes, Vermeidung von ungewollter Erregerübertragung über die Kanüle, in Notfällen auch Durchführung durch ärztliches Hilfspersonal.

In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob eine aktive Immunisierung über die Wunde grundsätzlich möglich ist. Benutzt wurde das Modell "Tetanus-Maus" (6), wobei zur Immunisierung *Clostridium tetani*-Toxoid verwendet wurde. Zum Vergleich impften wir in einem Versuch mit *Clostridium novyi*-Toxoid.

2. S C H R I F T T U M

2.1. Überblick über die wichtigsten lokalen Impfmethoden

Als lokale Immunisierung bezeichnet man alle Impfmetho-
den, bei denen das Antigen dem Organismus auf enteralem
oder kutanem Wege zugeführt wird. Im Gegensatz zu den
parenteralen Schutzimpfungen werden die äußeren oder
inneren Oberflächen des Körpers nicht künstlich umgan-
gen. Der Impfstoff wird mit der Haut oder Schleimhaut
unmittelbar in Kontakt gebracht. Zu lokalen Schutzimpfun-
gen zählt man die orale, kutane, nasale, tracheale, rekta-
le, vaginale, vesikale und uterine Impfstoffapplikation(12).

Die Bezeichnung "lokale Immunisierung" ist historisch
zu verstehen und gibt vom Wort her keinerlei Aufschluß
über dieses Impfverfahren oder gar über Wesen und Ur-
sache des Impfschutzes. Die älteren Autoren, insbesondere
BESREDKA(8), nahmen an, daß bei dieser Impfarm ausschließ-
lich eine lokale, scharf begrenzte Gewebeimmunität am
Ort der Antigenanwendung entsteht. Heute weiß man, daß
diese Auffassung falsch war und daß es nach lokaler,
wie auch nach parenteraler Immunisierung, zu einer all-
gemeinen Immunitätsreaktion kommen kann.

Der Begriff lokale Immunisierung wurde bis heute bei-
behalten. Erst in neuerer Zeit sind Bestrebungen im
Gang, den etwas irreführenden Begriff "lokal" durch
"non-parenteral" zu ersetzen. Ob sich diese neue Be-
zeichnung durchsetzen wird, muß aber erst die Zukunft
zeigen(113).

2.2. Lokale Impfverfahren zur Bekämpfung bakterieller Erkrankungen

2.2.1.Grundlagen

Auf der Suche nach wirksamen Schutzmaßnahmen gegen die Infektionskrankheiten wurde schon früh versucht, den Impfstoff direkt auf die Haut oder Schleimhaut zu applizieren. Die ersten bedeutsamen Versuche gehen auf den Beginn dieses Jahrhunderts zurück. Obwohl sich in diesen Versuchen die lokale Immunisierungsmethode in Tier- und Feldversuchen als wirksam erwies, konnte sie sich bis vor wenigen Jahren nicht gegen die parenterale Impfung durchsetzen. Der Hauptgrund hierfür war, daß lange Zeit der Wert einer Impfmethode nur anhand der Höhe der Antikörpertiter im strömenden Blut bemessen wurde. Ein Impfverfahren, wie das lokale, bei dem dieses Charakteristikum nur schwach oder in wechselndem Ausmaß ausgeprägt war, hatte trotz praktischer Impferfolge keine Möglichkeit, von der Mehrzahl der Forscher anerkannt zu werden. Erst der Beweis für das Bestehen einer lokalen Immunität und die Erkenntnis, daß diese Immunität praktisch nur durch die lokale Impfung stimuliert werden kann, brachten einen neuen Aufschwung für die lokale Impfmethode(12).

Der Schwerpunkt der bisherigen Untersuchungen lag auf der oralen Impfung. Alle anderen Impfverfahren spielten nur eine untergeordnete Rolle. Im folgenden sollen deshalb, stellvertretend für alle lokal anwendbaren Impfstoffe, die Oralimpfstoffe zusammengefaßt und besprochen werden. Dabei geht es vor allem um die Frage, ob an "Lokalimpfstoffe" andere Anforderungen gestellt werden müssen als an "Injektionsimpfstoffe". Wegen der Vielzahl der Veröffentlichungen wird diese Literaturzusammenstellung auf Impfstoffe gegen bakterielle Erkrankungen beschränkt.

2.2.2. Impfstoffe zur oralen Immunisierung

2.2.2.1. Lebendimpfstoffe

2.2.2.1.1. Impfstoffe aus Bakterienstämmen mit geringem Wachstum im Wirt

2.2.2.1.1.1. Biochemische Mangelmutanten

GERMANIER und FÜRER untersuchten verschiedene avirulente Mutanten von *Salmonella typhi* auf ihre Immunogenität. Nur nach Immunisierung mit einer "Gal-E-Mutante" erhielten sie einen Schutz, der dem nach einer Infektion mit virulenten S-Formen erhaltenen, sehr ähnlich war. Diese Stämme sind durch das Fehlen des Enzyms UDP(Uridin-diphosphat)-galaktose-4-epimerase charakterisiert. Sie können selbst nicht Galaktose, das zur Synthese der Zellwandlipopolysaccharide benötigt wird, fermentieren. Nur wenn Galaktose exogen zugeführt wird, bauen diese Mutanten kurzfristig die Galaktose ein und synthetisieren dann die gleichen Zellwandbausteine wie S-Formen. Bei längerer Zufuhr von exogener Galaktose lysieren die Bakterien. Auf diesem Mechanismus beruht die Avirulenz der Gal-Mutanten. In oralen Immunisierungsversuchen waren Lebendimpfstoffe aus Gal-E-Mutanten deutlich wirksamer als Impfstoffe aus abgetöteten S-Stämmen(38).

Über andere biochemische Mangelmutanten wie z.B. Adenin-abhängige *Salmonella typhimurium*-Stämme(34) oder Purin- und Paraaminobenzoesäure-abhängige Stämme von *Salmonella typhi*(4) liegen noch keine Erfahrungen mit der oralen Immunisierung vor.

2.2.2.1.1.2. Streptomycinabhängige Mutanten(Sm-d)

Über die orale Immunisierung mit streptomycin-abhängigen Mutanten als Impfstamm liegen viele Untersuchungen vor.

Sm-d-Stämme von *E. coli*(26,27,64,65), *Salmonella dublin* (76), *Salmonella typhimurium*(17,98), *Salmonella typhosa* (93), *Salmonella typhi*(48), *Salmonella enteritidis*(53), *Shigella*(23,72,73), *Vibrio cholerae*(27) wurden bisher im Tierexperiment und Feldversuch geprüft. Der Impferfolg war in allen Fällen befriedigend.

Die Sm-d-Stämme sind dadurch charakterisiert, daß sie nur in einem streptomycinhaltigen Nährmedium wachsen und auch nur in einem streptomycinangereicherten Milieu überleben können. In einem streptomycinfreien Milieu, wie z.B. im tierischen Organismus, werden die Keime sehr schnell abgebaut und sind nach einigen Tagen nicht mehr nachweisbar. Die Reversionshäufigkeit zur Streptomycin-Unabhängigkeit betrug nach LINDE et al(65) stammabhängig zwischen 2 bis 592 Revertantenkolonien auf 10^8 eingesäte Sm-d-Keime. Bei Sm-d-Keimzahlen über 5×10^8 pro Agarplatte oder 5 ml Fleischbouillon zeigten sich keine Revertanten. In Mischkulturen mit anderen Enterobakterien wurden alle Revertanten überwuchert.

Die Immunantwort nach Impfung mit Sm-d-Stämmen entspricht im wesentlichen der nach Impfung mit inaktivierten Keimen. Der einzige Vorteil der Sm-d-Stämme soll darauf beruhen, daß es zu einer Ansiedlungshemmung im Darm kommt, die nach Impfung mit Totantigen ausbleibt. Eine verstärkende Wirkung auf die Immunogenität wurde beobachtet durch die zusätzliche orale Applikation von Streptomycin(110).

2.2.2.1.1.3. Temperaturempfindliche Mutanten

Nach Einwirkung der mutagen wirkenden Verbindung N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin auf *Salmonella enteritidis*-Kulturen isolierten FAHEY und COOPER(25) mehrere Mutanten, die bei Bebrütung mit 37°C wesent-

liche Unterschiede zur Ausgangskultur aufwiesen. In flüssigem Medium wuchsen die Mutanten langsamer und während der Bebrütungszeit nahm die Zahl der lebensfähigen Kolonien ständig ab. Die mutierten Stämme waren unfähig, sich bei 37°C zu teilen. Nach 3 bis 6 Stunden Bebrütung wuchsen sie zu einem Gewirr von extrem langen Filamenten aus. Elektronenoptische Untersuchungen zeigten, daß die Mutanten keine Quersepten in den Filamenten bilden. Wahrscheinlich hängt dieser genetische Defekt mit dem Unvermögen, bei 37°C Nährstoffe aufzunehmen, zusammen. Bei Bebrütung mit 28°C dagegen waren zumindest die phänotypischen Eigenschaften der Mutanten denen der Wildstämme ähnlich. Sie vermehrten sich im selben Ausmaß und bildeten auf festen Nährböden die gleichen Kolonien. Biochemische Untersuchungen zeigten, daß Biosynthese und Metabolismus der Mutanten denen der Wildstämme ähnlich war. Durch Agglutination und Agglutinations-Absorptionsreaktion konnte aber ein Unterschied in der Antigenität festgestellt werden: Die Temperatur-Mutanten produzieren bei 28°C kein Geißelprotein. Eine Umwandlung der Mutanten in temperaturunempfindliche Formen wurde nicht beobachtet.

Im aktiven Schutzversuch ergaben sich schon nach zweimaliger Immunisierung gute Schutzwerte von 87 bis 97, die nur unwesentlich schlechter waren als die nach parenteraler Immunisierung.

2.2.2.1.1.4. Dwarf colony-Mutanten

Die Bezeichnung dwarf colony-Mutante wurde gewählt, weil diese Mutante auf Nähragar bei Bebrütung mit 37°C sehr viel kleinere Kolonien bildet als der Ursprungsstamm.

BHASKARAN und SINHA(9) führten mit einer purinabhängigen dwarf colony-Mutante von *Vibrio cholerae* Immunisierungsversuche an der Maus durch. Im Schutzversuch war der mutierte Stamm genauso wirksam wie der Wildstamm. Der typische dwarf colony-Charakter blieb über den gesamten Untersuchungszeitraum von 6 Monaten ein sicheres Merkmal dieser Mutante. Die Avirulenz für Versuchstiere (Maus, Küken und Kaninchen) ist ein Zeichen für die Unfähigkeit dieses Stammes, sich im tierischen Gewebe zu vermehren und Toxine zu bilden.

2.2.2.1.1.5. Interspezies-Hybriden

FORMAL(28) sowie DUPONT und HORNICK(23) verwendeten einen hybridisierten *Shigella*-Impfstamm zur oralen Immunisierung. Der *Shigella flexneri*-Ausgangsstamm war unfähig, Darmepithelzellen anzugreifen. Erst die Hybridisierung mit *E. coli* brachte die benötigte Virulenz für den Impfstamm und damit die Möglichkeit in das Darmepithel einzudringen. Beim Hybridisierungsvorgang wird die Xylose-Rhamnose-Region des *E. coli*-Chromosoms in das *Shigella*-Genom eingebaut. Auch mit einem polyvalenten Oralimpfstoff aus verschiedenen Hybridstämmen von *Shigellen* konnte bei Affen eine ausreichende Immunität hervorgerufen werden. Kreuzimmunitäten mit Stämmen, die nicht in der Vakzine enthalten waren, wurden nicht beobachtet. Eine einmalige Impfung mit dem Hybridstamm erzielte die gleiche Wirkung wie eine fünfmalige Impfung mit dem nicht hybridisierten Stamm.

2.2.2.1.2. Impfstoffe aus Bakterienstämmen mit Verlust bzw. Verminderung des somatischen Antigens

In diese Gruppe gehören die R-Formen der verschiedenen Bakterienstämme. Seit bekannt ist, daß die R-Formen we-

niger virulent als die S-Formen sind, wurde versucht, mit den R-Formen orale Impfungen durchzuführen. Neben der Virulenz fehlt diesen Mutanten aber auch der O-Antigencharakter der S-Formen. R-Formen enthalten in ihren somatischen Lipopolysacchariden im Gegensatz zu S-Formen keine Rhamnose, Mannose und Arabinose. Dies führt zu einer Strukturänderung des spezifischen Polysaccharids. Die übrigen Komponenten im Endotoxin-komplex, also das Lipoid und das Protein, bleiben unverändert.

GERMANIER(37) erreichte mit einer R-Mutante von *Salmonella typhimurium* durch orale Immunisierung einen Schutzwert von 80 Prozent im Gegensatz zu 100 Prozent bei intraperitonealer oder subkutaner Applikation.

Es gibt aber auch S-Formen, die keine Virulenz besitzen, wie z.B. der Stamm M 206 von *Salmonella typhimurium*(3). Dieser avirulente Stamm besitzt aber um etwa 50 Prozent weniger Polysaccharid als der virulente Ausgangsstamm (oS). Den Unterschied in der Virulenz führen ARCHER und ROWLEY(3) darauf zurück, daß bei virulenten Stämmen die Antikörperreaktion auf die äußere Region der Bakterienoberfläche beschränkt ist, während es bei den avirulenten Stämmen zu einer oberflächennahen Bindung der Antikörper kommt. Die Folge ist, daß die avirulente Bakterienzelle sehr viel rascher vom Wirtsorganismus eliminiert und lysiert wird.

2.2.2.1.3. Impfstoffe aus Bakterienstämmen mit geringer oder veränderter Toxinproduktion

MUKHERJEE(38) isolierte aus dem Wasser in cholerafreien Gebieten Stämme von *Vibrio cholerae*, Biotyp El Tor, die im Gegensatz zu den pathogenen Stämmen nur sehr wenig

Toxin produzierten. Die Antigenstruktur dieser Stämme war aber der des klassischen *Vibrio cholerae*-Stammes sehr ähnlich. Eine Lebendvakzine aus diesen natürlich vorkommenden apathogenen Stämmen führte nach oraler Anwendung zu einer zuverlässigen Immunität gegen die pathogenen Feldstämme (11). Es sollte bei der Anwendung solcher Stämme aber nicht vergessen werden, daß in der Toxinbildung zwischen pathogenen und avirulenten Stämmen nur ein quantitativer Unterschied besteht. In einem geeigneten Milieu können vielleicht Toxintiter erreicht werden, die zur Erkrankung führen.

Die Toxinqualität von pathogenen Feldstämmen zu verändern gelang HOWARD (49) mittels Genmutation. Die Mutation veränderte das für das Choleratoxin verantwortliche Strukturgen und führte zur Produktion eines Proteins, das veränderte biologische Aktivitäten aufwies, aber eine normale Antigenaktivität zeigte. Eine belastbare Immunität wurde mit einer lyophilisierten Kultur dieser *Vibrio cholerae*-Mutante erreicht, die zur oralen Immunisierung durch eine Kapsel vor dem Abbau im Magen geschützt wurde (49). Solch eine Vakzine erzeugte jedoch keinen langdauernden Schutz, da der *V. cholerae*-Impfstamm nur einige Tage im Intestinum überlebte. HOWARD konnte das Ergebnis verbessern, wenn der mutierte *V. cholerae*-Stamm auf einen anderen Bakterienstamm übertragen wurde, der Teil der normalen Bakterienflora des Verdauungskanales war. Dieser Stamm produzierte dann ständig in kleinen Mengen das Toxin, das die Bildung neutralisierender Antikörper stimulierte.

2.2.2.1.4. Impfstoffe aus "Feldstämmen"

Eine orale Impfung mit unveränderten Erregern ist nur möglich bei Tieren, die für diese Erreger nicht oder nicht mehr empfänglich sind oder bei empfäng-

lichen Tieren in subletaler Dosierung.

In der letzten Zeit hat vor allem die orale Impfung der Mutterschweine mit lebenden unveränderten *E. coli*-Bakterien an Bedeutung gewonnen. KOHLER(56) und NIKO-NOVA(80) fütterten tragenden Sauen im letzten Trächtigkeitsdrittel lebende, für Ferkel pathogene *E. coli*-Stämme. Die orale Gabe dieser Bakterienstämme führte bei erwachsenen Schweinen zu keinen klinischen Erscheinungen, aber trotzdem zu einer wesentlichen Boosterung der Antikörpertiter im Blut.

Über die orale Impfung mit unveränderten Erregern in subletaler Dosis liegen nur sehr wenige Untersuchungen vor(15). Diese Impfstoffe dürften auch für die Praxis keine Bedeutung erlangen, denn die Gefahr der Erregerübertragung und Erregerverschleppung ist viel zu groß.

2.2.2.2. Impfstoffe aus inaktivierten Bakterien oder ihren Antigenen.

2.2.2.2.1. Impfstoffe aus inaktivierten Bakterien

2.2.2.2.1.1. Inaktivierung mit physikalischen Verfahren

Für die Inaktivierung der Bakterien wurden bisher folgende physikalischen Methoden verwandt:

- a) thermische Behandlung
- b) Frier-Tau-Verfahren
- c) UV-Bestrahlung
- d) Röntgenbestrahlung und
- e) Ultraschallbehandlung.

Die Inaktivierung der Bakterien durch thermische Behandlung gehört zu den gebräuchlichsten Methoden. Man unterscheidet dabei zwei verschiedene Verfahren: Die Langzeitinaktivierung bei mittlerer Temperatur (ca. 60°C) und die Kurzzeit- bzw. Langzeitinaktivierung bei hoher Temperatur (ca. 100°C bis 120°C). KORDES et al (59) hatten in vergleichenden Versuchen mit *Salmonella typhimurium* festgestellt, daß bei einer Temperatur von ca. 100°C für 3 Minuten die Antigenität der Bakterien am besten erhalten bleibt. Der durch Kurzzeitinaktivierung hergestellte Impfstoff war im aktiven Schutzversuch dreimal so gut wie alle anderen Impfstoffe.

Thermoinaktivierte Oralvakzinen wurden bisher gegen folgende Erreger hergestellt: *E. coli*(5,44,63,64,66,82,86,103,107), *Salmonella*(52,57,60,87,109,110), *Vibrio*(1,32), *Shigella*(16,21,24,35,79,100), *Bordetella*(42,47), *Mykobakterium*(13,29), *Listeria*(83), *Brucella*(79) und *Pneumococcus*(18,96).

Beim Frier-Tau-Verfahren erfolgt die Inaktivierung durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der Bakterien(62,106).Obwohl die Ergebnisse zufriedenstellend waren,besitzt dieses Verfahren,wie auch die Inaktivierung durch Ultraschallbehandlung(89),wegen der schwierigen Standardisierung nur wenig Chancen für die Praxis.

Die Inaktivierung der Bakterien mit UV-Licht gehört zu den weniger gebräuchlichen Methoden.Wichtig für die Erhaltung der Immunogenität des Antigens ist der verwendete Wellenbereich,der möglichst so gewählt werden muß,daß das Protein geschont wird.So erzielte KORDES mit der Wellenlänge 254 nm einen Schutzeffekt von ca. 43,im Bereich 280 nm nur einen von 19(57).

NEGRETII(78) prüfte die Wirksamkeit von durch Röntgenstrahlen inaktivierten Bakterien.Der Bereich der Bestrahlungsdosis lag zwischen 1 bis 2,5 Mrad.Auf diese Weise hergestellte Antigene von *Proteus vulgaris*,*E. coli*,*Staphylococcus aureus* und *Streptococcus faecalis* waren genauso gut wie durch Hitzebehandlung(85°C für 1 Stunde) hergestellte Antigene.

2.2.2.2.1.2.Inaktivierung mit chemischen Verfahren

Auch bei der Herstellung von Oralvakzinen wurden die gebräuchlichsten chemischen Inaktivierungsmittel geprüft.Interessanterweise blieben diese Impfstoffe in ihrer Wirksamkeit deutlich hinter den Thermovakzinen zurück.KORDES (59) erhielt mit einer formalinisierten *Salmonella*-Vakzine nur einen Wirkungsindex von 38,2, mit dem hitzeinaktivierten Antigen jedoch einen Wert von 70,9.Auch der acetoinaktivierte Impfstoff war deutlich schlechter als die hitzeinaktivierten Vak-

zinen(59).Formolvakzinen zur oralen Immunisierung wurden bisher aus Mykobacterium(19),Shigella(101),E. coli(82),Pasteurella(45) und Salmonella(14,50,59,62),acetoinaktivierte Vakzinen aus E. coli(82),V. cholerae(2) und Salmonella(51,58) hergestellt.

Relativ selten zur Inaktivierung verwendet wurden Phenol(70,94,104),Alkohol(102),Salzsäure(96),Chloroform und DMSO(58).Der Erfolg dieser Vakzinen war sehr unterschiedlich.Echte vergleichende Untersuchungen über die Wirksamkeit nach oraler Immunisierung liegen aber noch nicht vor.

2.2.2.2.2.Impfstoffe aus Bakterienextrakten oder -fraktionen

Neben den inaktivierten,kompletten Mikroorganismen wurden auch Impfstoffe aus Extrakten oder Spaltprodukten der Bakterien zur oralen Immunisierung verwendet.Der Grundgedanke dabei war,durch Spaltung des Vollantigens die Antigenkomponente zu gewinnen,die für die Immunität verantwortlich ist und gleichzeitig toxische Komponenten aus dem Impfstoff zu eliminieren.

Die Arbeitsgruppe um OCKLITZ und MOCHMANN(81) prüfte in breitangelegten Versuchen einen Natriumdesoxycholatrextrakt eines Dyspepsiecolistammes als Antigen für die orale Immunisierung.Dieser Extrakt besteht im wesentlichen aus Bakterienprotein.Das Antigen wurde zwar durch Erhitzen auf 100°C zerstört,aber nicht durch die Einwirkung des Magensaftes.Da das Natriumdesoxycholat eine starke Toxizität besitzt und es dem Antigen einen bitteren Geschmack verleiht,sollte es möglichst nur in gereinigter Form verwendet werden.In der Wirksamkeit entsprach das Natriumdesoxycholat-Antigen dem hitzeinaktivierten Vollantigen.

In allen anderen Versuchen dagegen waren die Bakterienfraktionen oder -extrakte in der Immunogenität dem Bakterien-Vollantigen unterlegen. KORDES I.(58,59) erhielt nach oraler Anwendung des Lipopolysaccharidkomplexes oder der RNS-Fraktion von *Salmonella typhimurium* nur die halbe Wirksamkeit des Vollantigens, während sich die Protein- und die Lipidfraktion nahezu als unwirksam erwiesen. BIRNSCHEIN(10) verwandte hochgereinigte chemische Fraktionen von *Salmonella typhimurium* -Ribonukleinsäure, Lipopolysaccharid, Lipid und Protein- und erzielte durchwegs schlechtere Ergebnisse als mit dem Vollantigen. KOLB(55) erreichte nach oraler Immunisierung mit mechanisch durch die Ribü-Pressé isolierten Zellwand- und Protoplasmafraktionen ebenfalls eine schwächere Immunität als mit dem Ganzzellimpfstoff.

In den Versuchen von FRATTINI(31) erwies sich die Glukolipidfraktion als ausgezeichnetes Antigen. GEKKER(36) isolierte aus Shigellen ein lösliches Polysaccharid-Eiweiß-Antigen, das weniger toxisch war als das Vollantigen und das dennoch die volle Antigenwirkung besaß. Vergleichende Versuche zwischen diesen Spaltantigenen und dem Vollantigen fehlen aber noch.

2.2.2.2.3. Impfstoffe aus Bakterientoxoiden oder -toxinen

Die orale Impfung gegen die Toxine der Bakterien spielt bisher nur eine untergeordnete Rolle. Als Impfstoff fanden die bei der parenteralen Immunisierung bereits bewährten Toxoidimpfstoffe Verwendung. Für die Herstellung der Toxoidimpfstoffe werden meist durch Formalin, gelegentlich auch durch Hitze entgiftete Toxine (Toxoide) benutzt.

Die meisten Untersuchungen liegen über die orale Toxoid-Immunisierung gegen *Clostridium tetani*(6,61,88,108) und *Corynebacterium diphtheriae*(43,88) vor.In einigen wenigen Versuchen prüfte man auch die Wirksamkeit von oral gegebenem *Clostridium botulinum*-(95,111),*Aeromonas punctata*-(97) und *Staphylococcus*-Toxoid(69).

Eine Sonderstellung nehmen die Untersuchungen von FUJATA und FINKELSTEIN(33) ein.Sie immunisierten Mäuse oral mit nicht toxischen Enterotoxinpräparationen von *Vibrio cholerae*.In dieselbe Richtung gehen die Versuche mit der oralen Gabe von reinen Toxinen in subletaler Dosierung (7,22,88,105).Trotz der relativ guten Wirksamkeit bleibt die Verwendung von Impfstoffen,die eine Resttoxizität besitzen,immer problematisch.

2.2.2.3. Adjuvantien bei Oralvakzinen.

Die wichtigsten zur Verwendung bei Schluckvakzinen geprüften Adjuvantien lassen sich in 2 große Gruppen einteilen:

1. Adjuvantien, die das Antigen vor dem Abbau im Magen- und Darmtrakt schützen sollen;
2. Adjuvantien, die die Resorptionsfähigkeit der Darmschleimhaut für das spezifische Antigen erhöhen sollen.

Zur ersten Gruppe gehören die säureneutralisierenden Verbindungen wie z.B. das Natriumbikarbonat, die kurz vor oder gleichzeitig mit dem Antigen verabreicht werden. Die Schaffung eines neutralen Magen- und Darmmilieus brachte aber nicht die erhoffte Immunitätssteigerung (71,84). Auch die Verabreichung des Antigens in Keratine- oder Gelatine kapseln, um es so vor der Magensäure zu schützen, verbesserte die Wirksamkeit der oralen Impfung mit bakteriellen Antigenen nicht (46,67).

In der Galle, die zur zweiten Gruppe der Adjuvantien gehört, glaubte schon BESREDKA (8) ein wirksames Adjuvans für die orale Immunisierung gefunden zu haben. In einem Versuch überlebten nur Tiere die Belastungsinfektion, die vor der Antigenapplikation zusätzlich Galle oral einnahmen. Diese Beobachtung wurde später noch mehrmals bestätigt (20,39,40). Ähnliches wurde auch bei gallensauren Salzen (20), hitzeinaktivierten Shiga-Kruse-Bakterien (54) und Natrium benzoicum (30, 90,91,92) festgestellt. Aber alle diese resorptionsfördernden Mittel sind relativ toxisch und bergen die Gefahr der Autoinfektion in sich. Selbst mit therapeutischen Dosen wurden bei Versuchstieren schwere Schädigungen der Darmwand und Diarrhoen mit nachfolgenden E. coli-Infektionen festgestellt. In neueren Un-

tersuchungen konnte RAETTIG(84,85) auch keine Verstärkung der Immunogenität des Antigens nach Verwendung dieser Stoffe als Adjuvantien beobachten.

In den letzten Jahren wurde der Gedanke, die Wirksamkeit der oralen Immunisierung durch Adjuvantien zu verbessern, erneut aufgegriffen. SCHMUDDE(99) prüfte in einer Versuchsreihe das Dimethylsulfoxid(DMSO) und GRABEN(41) das Freundsche Adjuvans. DMSO vermochte bei guter Verträglichkeit zwar die Permeabilität der Schleimhaut hochgradig zu verändern, zerstörte aber gleichzeitig die antigenen Eigenschaften des Impfstoffes. Auch durch Verwendung des Freundschen Adjuvans konnte weder in der inkompletten noch in der kompletten Form ein praktisch verwertbarer Impfstoff von erhöhter Wirksamkeit gewonnen werden. WALDMANN(110) testete Berylliumsulfat, eine Pertussis-Vakzine und Streptomycin als Adjuvantien. Während er bei den beiden ersten keine Verbesserung der Wirksamkeit feststellte, konnte er mit Streptomycin als Adjuvans eine Wirkungsverstärkung beobachten.

Nachdem bekannt geworden war, daß die Aristolochiasäure(Tardolyt) die Phagozytoserate erhöht, glaubte man mit dieser Substanz die Immunogenität des Antigens infolge stärkerer Verwertung des Antigens erhöhen zu können(84). Die Ergebnisse waren negativ, genauso wie nach Zusatz von Opium und Salol(71).

Bisher gelang es also nicht, durch Zusätze zu Oralvakzinen eine deutliche Verbesserung der Wirksamkeit zu erzielen. Die Suche nach wirksamen Adjuvantien sollte eine der vordringlichsten Aufgaben für die Zukunft sein(112).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden.

3.1.1. Versuchstiere.

Es wurden NMRI-Mäuse weiblichen Geschlechts mit einem durchschnittlichen Gewicht von 20 Gramm bei Versuchsbeginn verwendet. Die Mäuse wurden in Gruppen von jeweils 10 Tieren in Makrolonkäfigen gehalten. Die Fütterung erfolgte mittels Pellets der Fa. ALTROMIN, Lage/Lippe, die Tränke bestand aus in Tropfflaschen abgefülltem Leitungswasser. Beides wurde ad libitum angeboten. Die Kontrolltiere lebten unter den gleichen Bedingungen.

3.1.2. Impfstoff.

Zur Immunisierung verwendeten wir ein hochgereinigtes Tetanus-Toxoid-Konzentrat der Fa. BEHRINGWERKE AG, Marburg/Lahn. Es enthielt 1000 Lf¹⁾ pro ml. In einem Versuch prüften wir die Wundimmunisierung mit einem Clostridium novyi-Toxoid, ebenfalls von der Fa. BEHRINGWERKE AG. Die Gebrauchsverdünnung wurde bei beiden Toxoiden mit phys. NaCl-Lösung eingestellt.

3.1.3. Immunisierung.

Den Versuchstieren wurde das Toxoid in verschiedenen Dosierungen unter Narkose auf die Wunde geträufelt. Die Flüssigkeitsmenge betrug mit einer Ausnahme immer 0,1 ml.

1) Lf = Limes flocculationis = Flockungseinheit. Sie entspricht der Toxinmenge, die von 1 I.E. Tetanus-Antitoxin neutralisiert wird.

3.1.4.Wundsetzung.

Es sind mit den bekannten Methoden (74,75) folgende Wundarten gesetzt worden:

- 1.oberflächliche Hautwunden
- 2.tiefe Hautwunden
- 3.Fleischwunden
- 4.oberflächliche Brandwunden und
- 5.tiefe Brandwunden.

Grundsätzlich wurden die Tiere unter Allgemeinnarkose mit Nembutal der Fa. ABBOTT gehalten.Wundinfektionen traten nicht auf.

3.1.5.Belastungsversuche.

Am 18. Tag nach der Wundimmunisierung wurden die Versuchstiere mit Toxin belastet.Die Belastung erfolgte subkutan mit einem Clostridium tetani- bzw. Clostridium novyi-Toxin der Fa. BEHRINGWERKE AG,Marburg/Lahn.Das in getrockneten Zustand vorliegende Toxin wurde bei 4°C unter Vermeidung von Lichteinwirkung aufbewahrt. Die LD₅₀ des Toxins wurde an Mäusen bestimmt.Die Berechnung erfolgte nach der Methode von REED und MUENCH. Die Belastungsdosis betrug in allen Versuchen 10 LD₅₀.

Parallel zu den Impfungen sind als Kontrolltiere nicht geimpfte,gleichaltrige und gleichschwere Tiere mit 10 LD₅₀ der jeweiligen Toxine belastet worden.Die Toxindosis bewirkte in allen Versuchen eine hundertprozentige Letalität der Kontrolltiere.

3.1.6.Auswertung der Belastungsversuche.

Der Verlauf der Belastungsversuche wurde von uns über eine Dauer von vier Tagen beobachtet.

Die Beurteilung der Belastungsinfektion erfolgte nach folgenden Kriterien:

Tiere, die während der viertägigen Beobachtungszeit keine ausgeprägten, für einen lokalen oder generalisierten Tetanus typischen Symptome zeigten und deren Allgemeinzustand in dieser Zeit nicht gestört war, galten als immun. Tiere, bei denen tetanische Symptome in Form geringgradiger bis starker Lahmheit der Hinterextremitäten bzw. Zeichen eines generalisierten Starrkrampfes festgestellt wurden oder die innerhalb von vier Tagen durch die Testinfektion starben, wurden als nicht immun bezeichnet. Die ungeimpften Kontrolltiere starben ausnahmslos innerhalb dieser vier Tage.

Der durch die Immunisierung erzielte Wirksamkeitsindex (WI) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$WI = \frac{a - b}{a} \cdot 100$$

a = Zahl der belasteten Mäuse

b = Zahl der nach der Belastung gestorbenen Mäuse

3.2. Ergebnisse.

3.2.1. Wundimmunisierung mit Clostridium tetani-Toxoid.

3.2.1.1. Einfluß der Antigenkonzentration auf die Immunität.

Da vergleichende Ergebnisse bei der Wundimmunisierung mit Clostridium tetani-Toxoid nicht vorliegen, prüften wir zuerst, ob über die tiefe Hautwunde überhaupt eine Wundimmunisierung möglich ist und welchen Einfluß die Antigenkonzentration auf den Wirksamkeitsindex besitzt. Hierzu impften wir Mäuse mit Toxoidmengen von 25, 10, 2 und 1 Lf. Eine Vergleichsgruppe erhielt 2 Lf subkutan. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 1 zusammengestellt.

Wie aus der Abbildung 1 ersichtlich ist, benötigt man für eine wirksame Immunisierung über die tiefe Hautwunde eine nur unwesentlich höhere Antigenmenge als für die subkutane Impfung. Nach einer einmaligen subkutanen Impfung mit 2 Lf Toxoid erreicht man einen Wirkungsindex von 100. Bei gleicher Dosis ergibt sich für die Wundimmunisierung ein Wert von 80. Eine Steigerung der Immunisierungsdosis um das Fünffache auf 10 Lf bringt den gleichen Wirksamkeitsindex wie die einmalige subkutane Impfung.

3.2.1.2. Einfluß des Immunisierungszeitpunktes nach der Wundsetzung auf die Immunität.

In den ersten Versuchen wurde das Toxoid sofort nach Wundsetzung appliziert. Für die Praxis ist es entscheidend, in welchem Zeitraum nach der Wundsetzung noch eine erfolgreiche Immunisierung möglich ist. Diese Frage

untersuchten wir mit einer Dosis von 10 und 100 Lf Toxoid bei der tiefen Hautwunde. Aus der Kurve in Abbildung 2 ist ersichtlich, daß zwischen dem optimalen Immunisierungszeitpunkt, der Wirksamkeit der Wundimmunisierung und der Dosierung eine enge Korrelation besteht. Bis zu 3 Stunden nach der Wundsetzung erreicht man mit beiden Dosierungen eine hundertprozentige Wirksamkeit. Nach 5 Stunden beobachten wir bei einer Dosis von 10 Lf einen Wirksamkeitsverlust von 20 Prozent und 24 Stunden nach der Wundsetzung ist über eine Wundimmunisierung mit 10 Lf keine Immunität mehr zu erzielen. Bei den mit 100 Lf immunisierten Tieren tritt erst nach 24 Stunden ein starker Wirksamkeitsverlust auf. Nach 48 Stunden beträgt er bereits 80 Prozent, während nach 96 Stunden überhaupt kein Impferfolg mehr zu erzielen ist.

3.2.1.3. Einfluß der Wundart auf die Immunität.

Mit den bereits erwähnten Ergebnissen konnten wir beweisen, daß eine Immunisierung über die tiefe Hautwunde möglich ist. Es interessierte nun die Frage, ob eine Immunisierung gegen Tetanus auch über andere Wunden möglich ist und welchen Einfluß die Wundart auf den Immunisierungserfolg hat. Um diese Frage abzuklären, immunisierten wir Mäusegruppen vergleichend über folgende Wundarten:

1. tiefe und oberflächliche Hautwunde
2. Fleischwunde
3. tiefe und oberflächliche Brandwunde

Wie die Abbildung 3 zeigt, bestehen keine Unterschiede zwischen Hautwunden, Fleischwunden und tiefen Brandwun-

den. In allen Fällen erreicht man mit einer Toxoiddosis von 10 Lf einen hundertprozentigen Schutz. Eine Ausnahme bildet nur die oberflächliche Brandwunde. Bei dieser Wundart gelingt es nur nach Verabreichung einer zehnfachen Dosis (100 Lf), alle Tiere gegen die tödliche Toxindosis zu schützen.

3.2.1.4. Einfluß der Wundgröße auf die Immunität.

Auch die Wundgröße könnte einen Einfluß auf die Wundimmunisierung nehmen. Wie aber aus der Abbildung 4 ersichtlich ist, sind die Unterschiede relativ gering. Die Impfdosis (2 Lf) wurde so gewählt, daß eventuell auftretende Wirksamkeitsunterschiede deutlich ausfallen. Bei gleicher Impfdosis, aber unterschiedlicher Wundgröße und verschiedenem Impfvolumen liegen die Wirksamkeitsindizes der verschiedenen Gruppen zwischen 80 und 90 Prozent. Allein ausschlaggebend für die Immunität nach der Wundimmunisierung ist also wie bei anderen Impfverfahren die Impfdosis.

3.2.1.5. Einfluß der Wundversorgung auf die Immunität.

Am Beispiel der tiefen Hautwunde untersuchten wir den Einfluß der Wundversorgung auf die Immunitätsbildung. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 zusammengestellt. Die Immunisierung über die Wunde wird weder durch eine Wundklammerung noch durch einen Sprayverband, der in einem Fall vor, im anderen Fall nach der Wundimmunisierung gesetzt wurde, beeinflusst. In allen Gruppen wurde, wie auch in der Kontrollgruppe, ein 100%iger Schutz erreicht.

3.2.1.6. Zeitliche Entwicklung der Immunitätsbildung.

Die zeitliche Entwicklung der Immunität nach Wundimmunisierung entspricht bei gleicher Toxiddosis der nach einer subkutanen Impfung. Die Toxiddosis betrug 10 Lf. Eine nachweisbare Immunität tritt bei 40 Prozent der Tiere mit Beginn des 7. Tages auf, der höchste Wirksamkeitsindex wird bei beiden Immunisierungsverfahren am 8. Tag erreicht. Auch am 50. Tag besteht noch ein Schutzwert von 100 Prozent (Abb. 6).

3.2.1.7. Einfluß einer oftmaligen Immunisierung in kurzen Zeitabständen auf die Immunität.

Für die Praxis ausschlaggebend ist die Frage, was geschieht, wenn ein Organismus in sehr kurzen Zeitabständen mehrmals über die Wunde immunisiert wird. Tritt eine Sensibilisierung oder eine Immunsuppression ein oder bleibt die Immunitätslage unverändert? Zur Prüfung dieser Frage mußten wir die subkutane Immunisierung wählen, da eine Wundimpfung über die gleiche Wunde mit 10 Lf bereits nach 24 Stunden und mit 100 Lf nach 96 Stunden erfolglos ist und eine mehrmalige Wundsetzung innerhalb weniger Tage bei derselben Maus aus technischen Gründen nicht möglich ist.

Die Tiere wurden innerhalb von 18 Tagen sechsmal, jeweils im Abstand von 3 Tagen, mit 2 Lf Tetanus-Toxoid geimpft und am Tag der letzten Impfung mit 10 LD₅₀ Tetanus-Toxin belastet. Alle Tiere überlebten die Belastung. Der Wirksamkeitsindex lag, gleichgültig ob die Tiere einmal oder sechsmal geimpft waren, bei 100. Man kann daraus schließen, daß auch bei einer mehrmaligen Immunisierung über die Wunde innerhalb kurzer Zeit kein Wirksamkeitsverlust auftritt.

3.2.1.8. Einfluß der Wundimmunisierung auf die Wundheilung.

Für die Beurteilung der Wundimmunisierung ist es von entscheidender Bedeutung, ob das über die Wunde applizierte Antigen die Wundheilung verzögert und stört. Im Fall des in unserer Versuchsreihe verwendeten Tetanus-Toxoids konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen geimpften und nicht geimpften Tieren festgestellt werden. In beiden Gruppen waren die Wunden, die bei der Wundsetzung 2140 mm^2 (jeweils die Gesamtfläche von 10 Tieren) groß waren, am 18. Tag nach der Wundsetzung vollkommen abgeheilt (Abb. 7). Bei der Verwendung anderer Antigene muß die Unschädlichkeit im Einzelfall neu geprüft werden.

3.2.2. Wundimmunisierung mit Clostridium novyi-Toxoid.

In diesen Versuchen wollten wir prüfen, ob die mit Clostridium tetani-Toxoid gewonnenen Ergebnisse sich auch auf andere Clostridien-Toxoide übertragen lassen. Dazu immunisierten wir Mäuse vergleichend mit Clostridium novyi- und Clostridium tetani-Toxoid über eine tiefe Hautwunde und subkutan. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 wiedergegeben.

In den über die tiefe Hautwunde mit 18 Bindungseinheiten (BE) Novyi-Toxoid und 10 Lf Tetanus-Toxoid immunisierten Gruppen erreichten wir einen Wirkungsindex von 100. Denselben Schutzwert erhielten wir bei beiden Toxoiden nach subkutaner Impfung mit einer vier- bis fünffach niedrigeren Dosis.

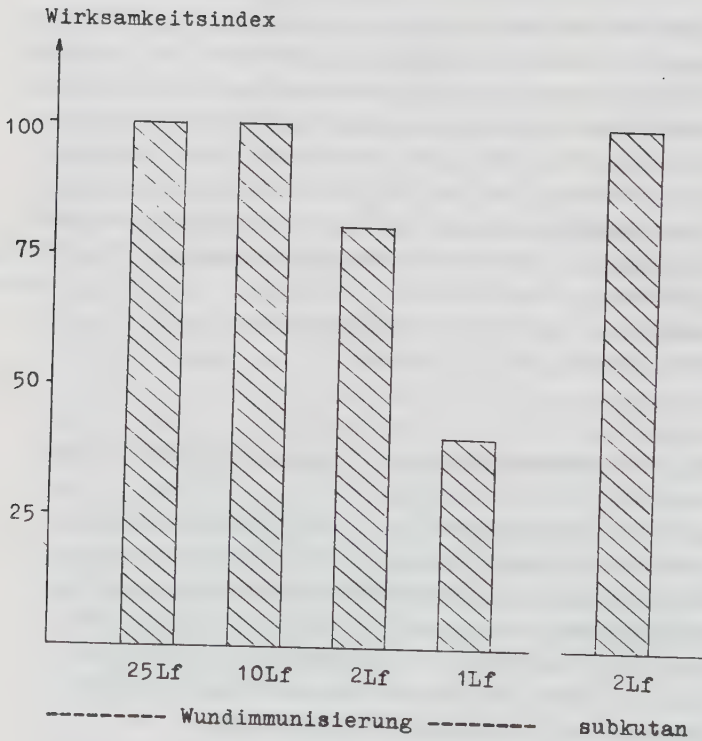


Abb. 1 : Wirksamkeit einer Wundimmunisierung(tiefe Hautwunde) im Vergleich zur subkutanen Schutzimpfung von Mäusen mit Tetanus-Toxoid mit unterschiedlichen Antigenmengen.

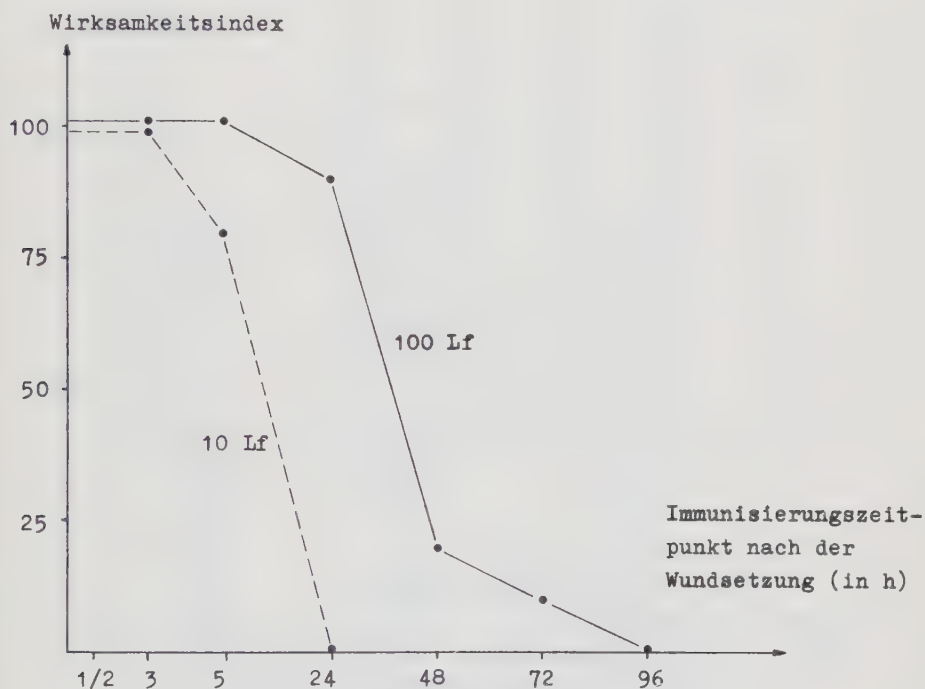
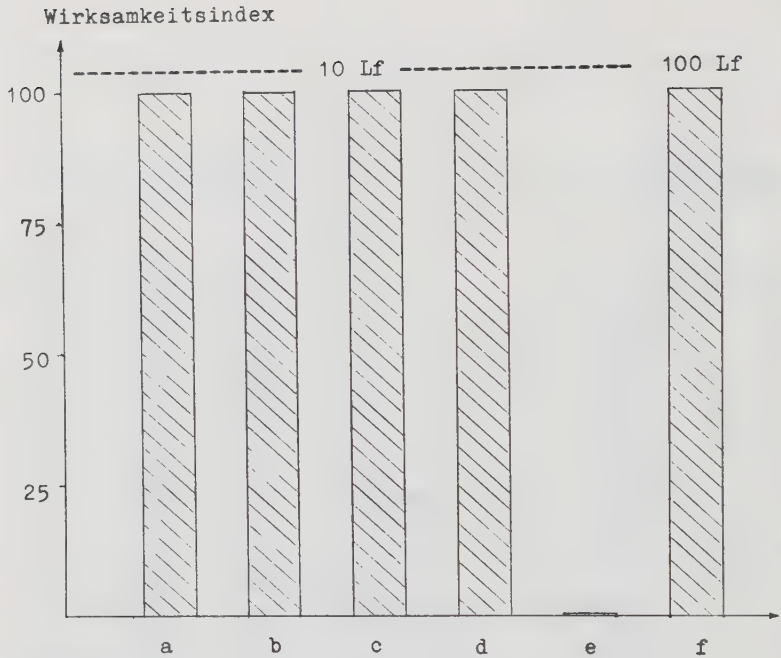


Abb. 2 : Einfluß des Zeitpunktes, zu dem nach der Wundsetzung immunisiert wird, auf den Schutzeffekt.



- a = tiefe Hautwunde
- b = oberflächliche Hautwunde
- c = Fleischwunde
- d = tiefe Brandwunde
- e = oberflächliche Brandwunde (10 Lf)
- f = oberflächliche Brandwunde (100 Lf)

Abb. 3 : Wirksamkeit einer Wundimmunisierung von Mäusen mit Tetanus-Toxoid bei unterschiedlichen Wundarten.

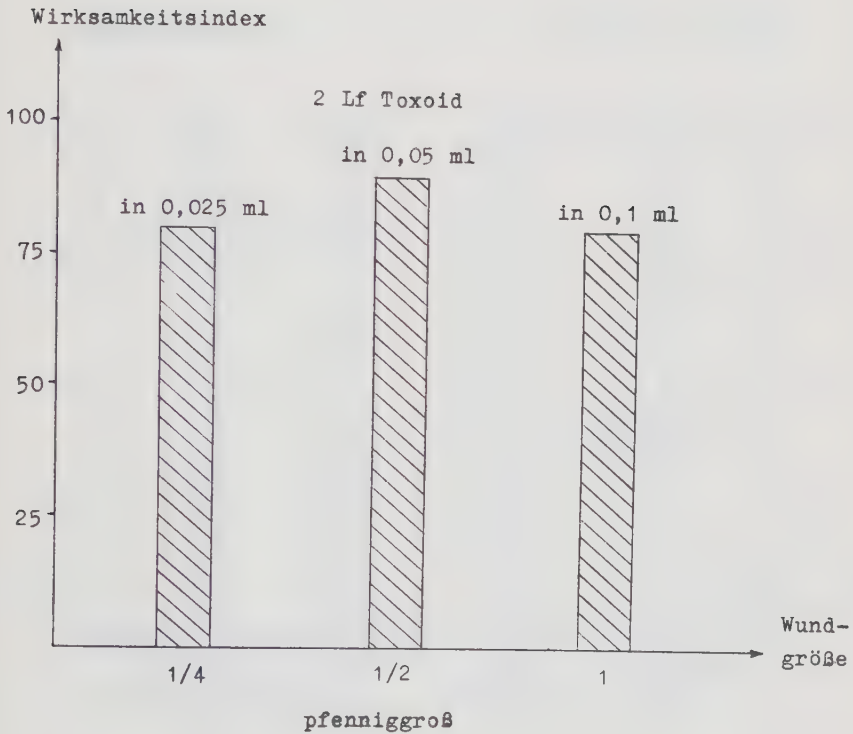


Abb. 4 : Einfluß von Wundgröße und Impfvolumen auf die Wirksamkeit einer Wundimmunisierung von Mäusen mit Tetanus-Toxoid.

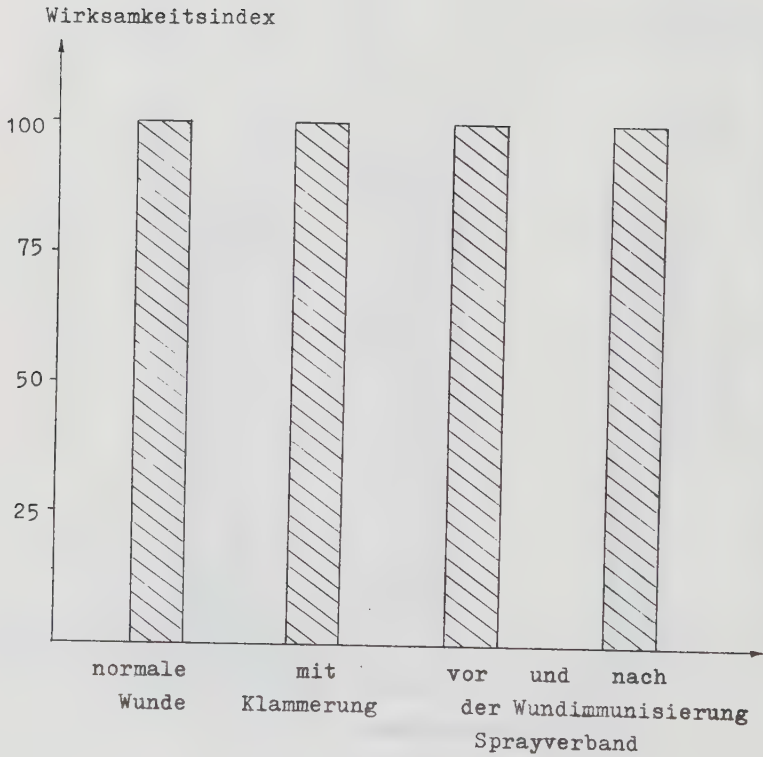


Abb. 5 : Einfluß der Wundversorgung auf die Wirksamkeit einer Wundimmunisierung von Mäusen mit Tetanus-Toxoid(10 Lf).

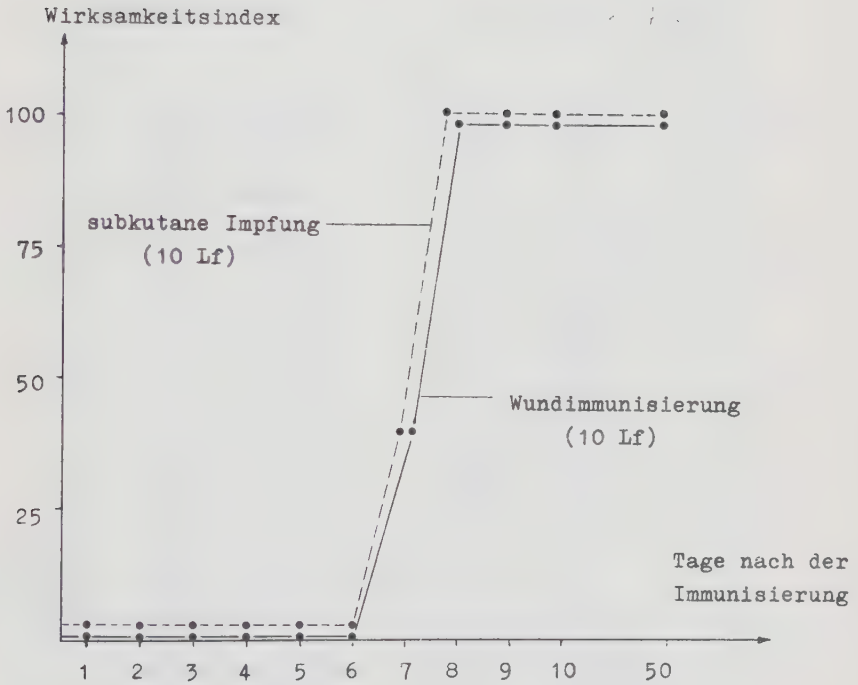


Abb. 6 : Zeitliche Entwicklung der Immunität nach Wundimmunisierung und subkutaner Immunisierung von Mäusen mit Tetanus-Toxoid.

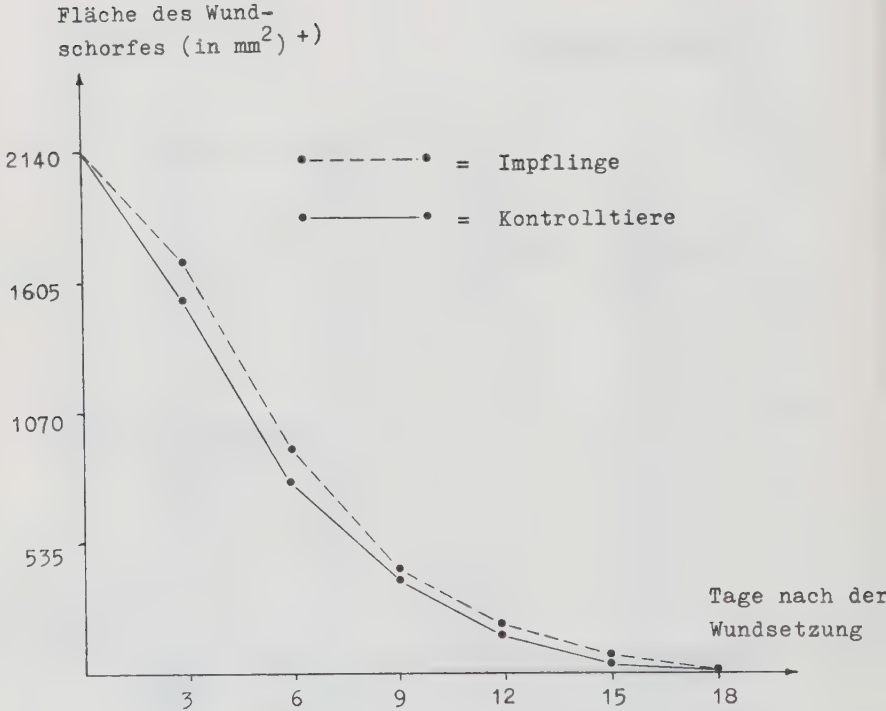


Abb. 7 : Wundheilung bei Mäusen nach Wundimmunisierung mit Tetanus-Toxoid im Vergleich zu den Kontrolltieren.

+) Gesamtfläche von jeweils 10 Tieren.

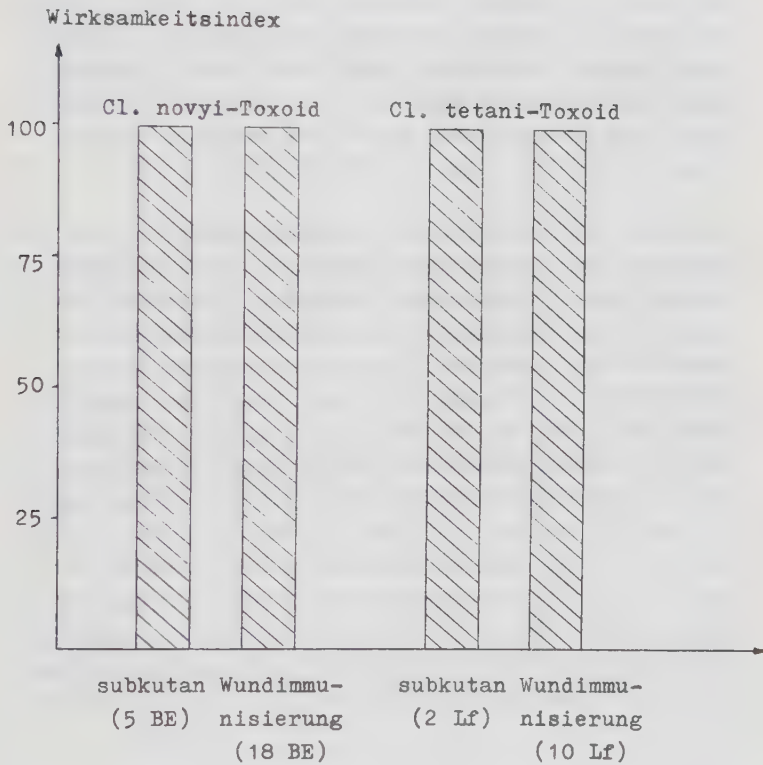


Abb. 8 : Wirksamkeitsvergleich zwischen der Wundimmunisierung mit Cl. novyi- und Cl. tetani-Toxoid und der jeweiligen subkutanen Methode.

4. B E S P R E C H U N G D E R E R G E B N I S S E

Mit der vorliegenden Untersuchung wurde erstmals nachgewiesen, daß es möglich ist, über Wunden in gleicher Weise gegen *Clostridium tetani* und *Clostridium novyi* zu immunisieren wie parenteral. Es ist anzunehmen, daß eine Immunisierung über die Wunde auch bei anderen Clostridienarten möglich ist.

Für die Wundimmunisierung wurden nur unwesentlich mehr Antigeneinheiten benötigt als für eine parenterale Schutzimpfung. Demgegenüber bietet die Wundimmunisierung alle wichtigen Vorteile der lokalen Impfmethode wie schnelle und einfache Applikationsweise, Anwendung durch nichtärztliches Sanitätspersonal oder sogar Selbstanwendung durch den Patienten. Impfreaktionen oder Verzögerungen in der Wundheilung bleiben aus. Für eine erfolgreiche Immunisierung ist es aber nötig, das Impfantigen innerhalb einer bestimmten Zeitspanne auf die Wunde aufzubringen. Entscheidend ist, daß ein noch resorptionsfähiges Gewebe angetroffen wird und daß das Impfantigen in einer bestimmten Konzentration appliziert wird. Wundart, Wundgröße und Wundversorgung sind ohne Einfluß auf den Immunisierungserfolg.

Alle diese Eigenschaften zeigen, daß die Immunisierung über die Wunde vor allem als Notimpfung in Katastrophenfällen angewandt werden kann.

Die Wundimmunisierung kann sicher nicht die parenterale Grundimmunisierung Gesunder als prophylak-

tische Maßnahmen ersetzen. Sie soll vielmehr zur Revakzination gegen Infektionserreger, die das ganze Leben über eine Gefahr darstellen, verwendet werden. Man wird dadurch sicher einen höheren Durchimmunisierungseffekt erreichen, als dies mit der parenteralen Impfung möglich ist. Denn Verletzungen treten selbst bei nicht exponierten Personen im Laufe eines Jahres des öfteren auf. Mehrmalige Impfungen in kurzen Zeitabständen schaden nicht.

Da also auf der einen Seite keine negativen Auswirkungen von der Wundimmunisierung zu erwarten sind, aber auf der anderen Seite ein höherer Durchimmunisierungseffekt möglich ist, kann man die Wundimmunisierung als neue lokale Impfmethode durchaus diskutieren. Besonders in Kriegszeiten und anderen Notsituationen und bei Personen mit erhöhter Verletzungsgefahr könnte die Wundimmunisierung der parenteralen Immunisierung überlegen sein.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

In Modellversuchen an der Maus wurde die Möglichkeit der lokalen Immunisierung über die Wunde untersucht. Zur Immunisierung verwendeten wir ein Tetanus-Toxoid. Der Immunitätsnachweis erfolgte im Belastungsversuch mit 10 LD₅₀ Tetanus-Toxin.

Für die Immunisierung über die Wunde werden nur unwesentlich höhere Antigenmengen benötigt als bei der subkutanen Immunisierung. Ein Wirksamkeitsindex von 100 wird subkutan mit 2 Lf Toxoid, über die Wunde mit 10 Lf erreicht.

Die Immunisierung muß möglichst sofort nach der Wundsetzung erfolgen. Sie scheint innerhalb der ersten 3 bis 5 Stunden optimal zu sein. Zu einem späteren Zeitpunkt benötigt man für die gleiche Wirksamkeit höhere Antigenmengen.

Eine Immunisierung über die Wunde ist praktisch bei allen Wundarten, selbst bei Brandwunden, möglich. Wundgröße sowie Wundversorgung beeinflussen die Wirksamkeit der Wundimmunisierung nicht.

Die Wundheilung wird durch die Wundimmunisierung nicht gestört.

Neben Tetanus-Toxoid ist für die Wundimmunisierung auch Cl. novyi-Toxoid verwendet worden. Die Belastung erfolgte mit 10 LD₅₀ Cl. novyi-Toxin. Da auch hierbei ein voll belastbarer Schutz erzielt werden konnte, dürfte es generell möglich sein, gegen Clostridien-Infektionen über die Wunde zu immunisieren.

SUMMARY

Model experiments in mice were used for the investigation of local immunization per wound with tetanus toxoid. The efficacy was tested by challenge with 10 LD₅₀ tetanus toxin.

For immunization per wound only slightly higher antigen doses are necessary compared with subcutaneous immunization. A single subcutaneous vaccination with 2 Lf tetanus toxoid and a single application per wound of 10 Lf resulted in the same efficiency index of 100.

Immunization per wound has to be carried out immediately after injury. It seems to be optimal within the first 3 to 5 hours. At a later time the same efficiency index can only be achieved by use of higher antigen doses.

Immunization per wound is possible with all kinds of wound, even with burns. Size of wound and wound-supply do not influence the efficacy of wound-immunization.

Immunization per wound does not disturb wound healing.

Beside tetanus toxoid Cl. novyi toxoid was also used for wound-immunization. Challenge was ensued with 10 LD₅₀ Cl. novyi toxin, and showed that sufficient protection was obtained. It is assumed that immunization per wound may generally be possible against Clostridium infections.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Agarwal, S.C.
N.K. Ganguly
Experimental oral immunization with
L-forms of *Vibrio cholerae*
Inf. Imm. 5, 31 (1972)
2. Agarwal, S.C.
N.K. Ganguly
Oral immunization with L-forms of
Vibrio cholerae in human volunteers
Inf. Imm. 6, 17 (1972)
3. Archer, J.R.
D. Rowley
A Quantitative Comparison of the An-
genic Structure of a virulent and an
avirulent Strain of *Salmonella typhi-*
murium
Immunology 17, 551-557 (1969)
4. Bacon, G.A.
T.W. Burrows
M. Yates
The Effects of biochemical Mutation
on the Virulence of *Bacterium typhosum*:
The Loss of Virulence of certain Mu-
tants
Brit. J. exp. Path. 32, 85-96 (1951)
5. Baljer, G.
S. Chorherr
E. Sickel
D. Giessen
Orale, aktive Immunisierung neugeborener
Ferkel gegen *E. coli*: Wirksamkeitsnach-
weis im Darmligaturtest
Zbl. Vet. Med. B, 22, 488-498 (1975)
6. Baljer, G.
H. Starflinger
K.-H. Sorg
J. Sailer
A. Mayr
Experimentelle Untersuchungen zur ora-
len Immunisierung mit Tetanus-Toxoid
Zbl. Bakt. I. Abt. Org. A, 232, 488-498 (1975)
7. Behring, E.v.
K. Wernicke
Über Immunisierung und Heilung von Ver-
suchstieren bei der Diphtherie
Z. f. Hyg. 12, 10 (1892)

8. Besredka, A. Über lokale Immunisierung
Naturwissenschaften 17, 395 (1927)
9. Bhaskaran, K. Attenuation of virulence in *Vibrio*
V.B. Sinha cholerae
J. Hyg. Cambr. 65, 135 (1967)
10. Birnschein, E. Die Schutzwirkung von oral gege-
benen Bakterienfraktionen im Tier-
versuch
Inaug. Diss. FU Berlin 1971
11. Blachmann, U. Production of Toxin by a nonpatho-
S. Basu genic Strain
M. J. Picket J. Infect. Dis. 122, 540-543 (1966)
12. Breuel, H. P. Lokale Immunisierung mit nichtver-
mehrungsfähigen Mikroorganismen oder
ihren Antigenen
Literaturdokumentation, Reihe H F
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1969
13. Calmette, A. Sur la vaccination contre la
G. Guerin tuberculose par les voies di-
gestives
C. R. Acad. Sci. 142, 1319-1322 (1906)
14. Cernaianu, C. Infection paratyphique spontanée
des canaris, causée par le bacille
du type Breslau ou Aertryck. Essais
de vaccination par voie buccale
C. R. Soc. Biol. 116, 262 (1934)
Zbl. Bakt. I. Abt. Ref. 116, 260 (1935)

15. Collins, F.M. Comparative immunogenicity of heat-
P.B. Carter killed and living oral Salmonella
 vaccines
 Inf.Imm.6,451(1972)
16. Cooper, M.L. Studies in Dysentery Vaccinations.
H.M. Keller VIII: Comparative Response and Per-
A.M. Hart sistence of Immunity in Mice Vaccinated
 intraabdominally or by Gavage with Shi-
 gella sonnei
 Z.Immunolog.63,465(1949)
17. Cvjetanovic, B. zit. nach Wld.Hlth.Org.Techn.Rep.
 Ser.500(112)
18. Dempe, H. Perorale Immunisierung mit abgetöteten
 Krankheitserregern bei jungen und er-
 wachsenen Säugetieren und Vögeln
 Z.Hyg.112,80(1931)
19. Dessy, G. Tentativi di terapia per via orale del-
 la tubercolosi sperimentale della avia
 con composti lipoidi del B. tubercu-
 lare e con l'anatubercolina integrale
 Petragani
 Boll.Ist.sieroter.Milan.20,155-160(1941)
 Zbl.Bakt.I.Abt.Ref.143,20(1943)
20. Dietrich, W. Resorption von Tetanusgift durch den
 Darm
 Klin.Ws.1,1160(1922)
21. Dopter, C. The administration of antidysenteric
 vaccines by the mouth
 Lancet 1908 I,1661
 Zbl.Bakt.I.Abt.Ref.183,1-54(1962)

- 22.Dumas,J. Action des Toxines tetanique et
D.Combiesco diphtherique per os
J.Balteano C.R.Acad.Sci.175,793(1922)
- 23.DuPont,H.L. Immunity in Shigellosis.I.Response
R.B.Hornick of Man to Attenuated Strains of Shi-
 gella
 J.Infect.Dis.125,5(1972)
- 24.Eguchi,C. Versuche über Immunisierung per os
 und Infektion an jungen und alten
 Mäusen und Meerschweinchen mit Rot-
 lauf,Mäusetyphus,Typhus und Ruhr
 Z.Hyg.105,91-97(1925)
- 25.Fahey,K.J. Oral Immunization against Experimen-
G.N.Cooper tal Salmonellosis.I.Development of
 Temperature-Sensitive Mutant Vaccine
 Infect.Imm.1,263-270(1970)
- 26.Felsenfeld,O. Oral Immunization with Polyvalent Strep-
R.H.Wolf tomycin-Dependent E.coli-Vaccine
W.F.Greer Appl.Microbiol.23,444-448(1972)
R.B.Brannon
- 27.Felsenfeld,O. zit. nach Wld.Hlth.Org.Techn.Rep.
 Ser.500(112)
- 28.Formal,S.B. Abortive Intestinal Infection with an
E.H.Labrec Escherichia coli-Shigella flexneri-
T.H.Kent Hybrid Strain
S.Falkow J.Bact.89,1374-1381(1964)
- 29.Fornet,W. "Edovaccin",der eßbare Impfstoff
 Münchn.med.Ws.1923,600

30. Fränkel, E. Versuche zur Frage der peroralen Immunisierung. Perorale Immunisierung bei der Maus gegen Paratyphus B
E. Schultz Z. Immun. Forsch. 53, 478 (1927)
31. Frattini, J. F. Consideraciones biofisicoquimicas sobre inmunización antitífica
Rev. Sanid. Milit. Argent. 53, 61 (1954)
Zbl. Bakt. I. Abt. Ref. 183, 1-54 (1962)
32. Freter, R. Detection of coproantibodies and its formation after parenteral and oral immunization of human volunteers
J. Infect. Dis. 11, 37 (1962)
33. Fuijata, K. Antitoxic immunity in experimental
R. A. Finkelstein cholera: comparison of perorally and parenterally induced immunity in mice
J. Infect. Dis. 125, 647 (1972)
34. Furness, G. Transduction of Virulence within the
D. Rowley Species Salmonella typhimurium
J. gen. Microbiol. 15, 140-145 (1956)
35. Gauthier, A. Essais de vaccinations et de vaccinothérapie par la voie buccale contre la dysenterie bacillaire
Rev. d'hyg. 46, 323 (1924)
Zbl. ges. Hyg. 2, 170 (1925)
36. Gekker, B. D. Die Benutzung eines gelösten Antigens der Dysenteriebakterien zur enteralen Immunisierung
Z. microbiol. epidem. immunobiol. 4, 30-35 (1954)
Zbl. Bakt. I. Abt. Ref. 157, 237 (1955)

37. Germanier, R. Immunity in experimental Salmonellosis.
I. Protection Induced by rough Mutants
of *S. typhimurium*
Infect. Imm. 2, 309-315 (1970)
38. Germanier, R. Isolation and Characterization of Gal E
E. Fürer Mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: A
Candidate for a live oral Typhoid Vac-
cine
J. Infect. Dis. 131, 5, 553 (1975)
39. Glotowa, E. zit. nach Graben, N. (41)
40. Golovanoff, M. De la vaccination anticolibacillaire.
Etude de l'immunité locale
C.R. Soc. Biol. 98, 660 (1928)
41. Graben, N. Zur oralen Immunisierung von Mäusen
mit inaktivierten *S. typhi murium*-
Bakterien in Form einer Wasser-in-Öl-
Emulsion aus kompletten und inkomplet-
ten Freundschens Adjuvans.
Inaug. Diss. FU Berlin 1971
42. Gray, D. F. Pertussis immunization: a comparison
of parenteral and oral routes in
mice
Exc. Med. IV, 3, 1008 (1950)
43. Greenberg, L. Experience with oral immunization
D. S. Fleming against diphtheria and tetanus in
human subjects
Can. J. Publ. Hlth. 41, 445 (1950)

44. Gwan, O.S. Recherches sur l'immunité anticoli-
 bacillaire (Deuxième memoire)
 Z.Immun.Forsch. 93, 278 (1938)
45. Heddleston, K.L. Fowl cholera: active immunity induced
 P.A. Rebers in chickens and turkeys by oral ad-
 ministration of killed Pasteurella
 multocida
 Avian Dis. 12, 129-134 (1968)
46. Hida, O. Aktive Immunisierung per os
 H. Toyoda Saikingaku-Zasshi 1907, 138
 Zbl.Bakt.I.Abt.Ref. 42, 418 (1909)
47. Hof, H. Zur Entstehung der generellen Immu-
 H. Finger nität nach oraler Aufnahme von abge-
 tötetten Pertussisbakterien
 Zbl.Bakt.I.A.Orig. 227, 282 (1974)
48. Hornick, R.B. zit. nach Wld.Hlth.Org.Techn.Rep.
 Ser. (112)
49. Howard, B.D. A Prototype Live Oral Cholera Vaccine
 Nature 230, 97-99 (1971)
50. Jantria, E. La vaccinazione antitifica per via
 orale con antigeni del bacillo del
 tifo disintegrati
 Boll.Ist.sieroter.Milan. 17, 160 (1938)
 Zbl.ges.Hyg. 42, 160 (1938)
51. Karolcek, J. Allgemeine Immunitätsreaktion beim Men-
 M. Draskovikova schen nach oraler Anwendung von Aceton-
 D. Georch inaktivierten Typhus-Enterioimpfstoffen.
 V. Milkulkova Zbl.Bakt.I.A.Orig. 211, 502 (1969)

52. Karolcek, J Allgemeine Immunitätsreaktion beim
M. Rusinko Menschen nach oraler Anwendung von
M. Draskovikova einem Typhus-Enterovaccinstoff
M. Milkulkova Zbl. Bakt. I. A. Orig. 197, 224 (1965)
L. Ba'teeroval
53. Kishimoto, Y. zit. nach Wld. Hlth. Org. Techn. Rep.
Ser. 500 (112)
54. Klüchlin, S. Weitere experimentelle Untersuchungen
G. über die Enterovaccination gegen Cho-
Wigodtschikoff lera, Typhus abdominalis und Dysenterie
Z. Immun. Forsch. 42, 98 (1925)
55. Kolb, H. J. Erfolg der oralen Impfung mit Zellwand-
und Protoplasmafraktionen aus Salmonella
typhimurium-Bakterien im Mäuseschutz-
versuch
Inaug. Diss. FU Berlin 1971
56. Kohler, E. M. Protection of pigs against neonatal en-
teric colibacillosis with colostrum and
milk from orally vaccinated sows
Am. J. Vet. Res. 35, 3, 331 (1974)
57. Kordes, B. Orale Immunisierung von Mäusen mit Impf-
stoffen aus physikalisch inaktivierten
Salmonella typhimurium-Bakterien
Inaug. Diss. FU Berlin 1969
58. Kordes, I. Vergleichende Tierexperimente mit Impf-
stoffen aus chemisch inaktivierten Sal-
monella typhimurium-Bakterien bei oraler
und subkutaner Immunisierung
Inaug. Diss. FU Berlin 1969

59. Kordes, I. Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 12. Mitteilung: Immunogenität verschiedener inaktivierter *S. typhimurium*-Vollantigene im Mäuseschutztest
B. Kordes
H. Pichl
B. Ganze
H. J. Raettig
Zbl. Bakt. I. A. Orig. 217, 242 (1971)
60. Kosmodemjanski, W. Vaccination per os gegen Paratyphus B
Z. Immun. Forsch. 64, 16 (1929)
61. Lemétayer, E. Essais d'immunisation active du lapin et du cobaye par administration d'anatoxine tétanique par les voies buccale et rectale
Presse méd. 1935, 761
Zbl. Bakt. I. Ref. 86, 119 (1935)
62. Lesbre, P. Immunisation expérimentale par voie digestive contre le bacille typhique
C. R. Soc. Biol. 98, 122 (1928)
Zbl. ges. Hyg. 17, 582 (1928)
63. Lietz, B. Orale Impfung mit inaktivierten Dyspepsiecoli-Bakterien bei Mensch und Tier
Inaug. Diss. FU Berlin 1969

64. Linde, K. Untersuchungen zur oralen Immunisierung
 H. Koch gegen Coli-Enteritis mit Streptomycin-
 dependenten Keimen. III. Mitteilung: Ver-
 gleich der Wirksamkeit von Impfstoffen
 aus abgetöteten und lebenden Strepto-
 mycin-dependenten EC-0111 B4-Bakterien
 im aktiven Mäuseschutzversuch sowie auf
 die Hemmung der Ansiedlung des homologen
 Sm-resistenten Stammes bei darm-sterilen
 Mäusen
 Zbl. Bakt. I. A. Orig. 211, 476 (1969)
65. Linde, K. Untersuchungen zur oralen Immunisierung
 H. Koch gegen Coli-Enteritis mit Streptomycin-
 M. Kittlick dependenten Keimen. I. Mitteilung: Charak-
 J. Kapell terisierung der Streptomycin-dependen-
 ten Impfstämme.
 Zbl. Bakt. I. A. Orig. 211, 453 (1969)
66. Lodenkämper, Über das Problem der oralen Immuni-
 H. sierung
 Wien. med. Ws. 1964, 860
67. Lumière, A. zit. nach Klüchin, S. (54)
 J. Chevrotier
68. MacLeod, C. M. Relation of virulence of pneumococcal
 M. R. Kraus strains for mice to the quantity of
 capsular polysaccharide formed in vitro
 J. exp. Med. 92, 1 (1950)
69. Maiorova, G. F. Oral immunization of animals and man
 V. F. with staphylococcus toxoid
 Korosteler J. Epidemiol. i. Microbiol. 5, 64-70 (1973)
 G. A. Trofimova ref. aus Vet. Bull. 44, 642 (1974)

70. Massell, B. F. Type-specific streptococcae immu-
J. G. Michael nization with oral vaccine
J. Bact. 86, 1346-1347 (1963)
71. McClintock, C. T. zit. nach Graben, N. (41)
72. Mel, D. M. Studies on Vaccination against Bacil-
A. L. Terzin lary Dysentery. 1. Immunization of Mice
L. Vuksic against Experimental Shigella In-
Bull. Wld. Hlth. Org. 32, 633 (1965)
73. Mel, D. M. Studies on Vaccination against Bacil-
A. L. Terzin lary Dysentery. 3. Effective Oral Immu-
L. Vuksic nization against Shigella flexneri 2a
in a Field Trial
Bull. Wld. Hlth. Org. 32, 647 (1965)
74. Messerschmidt, Untersuchungen über Kombinationsschä-
O. den. 6. Mitteilung: Über die Lebenserwar-
tung von Mäusen, die mit Ganzkörperbe-
strahlung in Kombination mit offenen
oder geschlossenen Hautverletzungen,
Bauchoperationen oder Kompressions-
schäden belastet wurden
Strahlentherapie 131, 2, 198-310 (1966)
75. Messerschmidt, Untersuchungen über Kombinationsschä-
O. den. Über die Lebenserwartung von Mäu-
H. Langendorff sen, die zu verschiedenen Zeiten vor
E. Birkenmayer und nach einer Ganzkörperbestrahlung
L. Koslowski mit Hautverbrennungen belastet wurden
Strahlentherapie 138, 5, 619-626 (1969)

76. Meyer, H. Untersuchungen zur Salmonellose des Kal-
 H. Hartmann bes. 2. Mitteilung: Immunisierungsversuche
 G. Steinbach mit attenuierten S. dublin-Keimen
 H. Koch Arch. exp. Vet. Med. 27, 301-304 (1973)
 M. Kittlick
 A. Stelzner
 K. Linde
77. Mukerjee, S. Preliminary Studies on the Development
 of a Live Oral Vaccine for Anti-Cholera
 Immunization
 Bull. Wld. Hlth. Org. 29, 753-766 (1963)
78. Negretti, F. Detection of specific antibodies in the
 faeces of laboratory animals (mice and
 rabbits) given radiation-inactivated
 bacterial vaccines by mouth
 Atti della Soc. Ital. delle Sci. Vet. 27, 645-648
 (1973)
 ref. aus Vet. Bull. 1974, Nr. 6'168
79. Nicolle, C. Vaccinations préventives par voie
 E. Conseil digestive chez l'homme dans la dys-
 enterie bacillaire et la fièvre
 mediteranéenne
 Ann. Inst. Pasteur 36, 579-613 (1922)
80. Nikonova, Effect of Colibacterin (dried culture
 T. G. for oral administration) on the
 carriage of haemolytic E. coli by
 piglets
 Veterinarya, Moscow. 6, 57-58 (1973)
 ref. aus Vet. Bull. 44, 11, 714 (1974)

81. Ocklitz, H.W.
H. Mochmann
E. F. Schmidt
L. Hering
Oral Immunization of Mice with a Soluble Protective Antigen obtained from Enteropathogenic Serotypes of *Escherichia coli*
Nature 214, 1053 (1967)
82. Piringer, W.A.
Orale Immunisierung weißer Mäuse durch *Dyspepsiecoli*
Zbl. Bakt. I. A. Orig. 196, 462 (1965)
83. Potel, J.
L. Degen
Zur Serologie und Immunbiologie der Listeriose. VI. Mitteilung. Spezifische Therapie und Prophylaxe der Listeriose beim Versuchstier
Z. Immun. Forsch. 123, 432 (1962)
84. Raettig, H.J.
Tierexperimente zur Durchlässigkeit des Intestinaltraktes
Zbl. Bakt. I. A. Orig. 191, 97 (1963)
85. Raettig, H.J.
Möglichkeiten der DMSO in der experimentellen Immunologie
Internationales DMSO-Symposium Wien 1966
Saladruck Berlin 1966
86. Raettig, H.J.
Arbeiten aus dem Bundesgesundheitsamt: Die orale Impfung mit inaktivierten Mikroorganismen.
Zehn Jahre Forschungsarbeit im Robert-Koch-Institut.
Bundesgesundheitsblatt Nr. 11, 141 (1971)

87. Raettig, H. J. Immunprophylaxe der Kälbersalmonellose durch orale Impfung mit inaktivierten Bakterien
G. Laudahn
M. Mülling
Fortschr. der Vet. Med. 17, 9 (1972)
88. Ramon, G. Sur l'immunité antitoxique active par voie buccale chez l'animal d'expérience
E. Grasset
C. R. Soc. Biol. 95, 36, 1405 (1926)
89. Rauss, K. Salmonella Immunity in Mice
B. Ralovich
Zbl. Bakt. I. A. Orig. 216, 32-53 (1971)
90. Reiter, H. Versuche über perorale Immunisierung
Dtsch. med. Ws. 52, 947 (1926)
91. Reiter, H. Versuche über perorale und perkutane Immunisierung
A. Kurakowa
Klin. Ws. 17, 744 (1926)
92. Reiter, H. Versuche einer prophylaktischen Immunisierung gegen Diphtherie auf peroralem Wege
M. Soldin
Dtsch. med. Ws. 52, 1337 (1926)
93. Reitmann, M. Infectivity and Antigenicity of Streptomycin-dependent Salmonella typhosa
J. Infect. Dis. 117, 101-107 (1967)
94. Richardson, M. Prenatal immunization by the oral route: Stimulations of Brucella antibody in fetal lambs
G. H. Connor
Inf. Imm. 5, 4, 454 (1972)

95. Roitman, M.J. Development of an enteral method
V.N. Mel'nikow of immunization against botulism.
I. Efficacy of enteral revaccination
J. Microbiol. Epidemiol. i. Immunobiol.
10, 48-51 (1963)
96. Ross, V. Oral immunization of humans against
the pneumococcus
J. Immunolog. 27, 307-352 (1934)
97. Schäperclaus, W. Orale und parenterale aktive Immuni-
sierung von Karpfen gegen *Aeromonas*
punctata
Arch. exp. Vet. Med. 26, 863 (1972)
98. Schimmel, D. Zum Einsatz einer Sm-d *Salmonella*
K. Linde typhimurium-Mutante bei Küken
G. Marx Arch. exp. Vet. Med. 28, 551 (1974)
K. Ziedler
99. Schmudde, R. Vergleichende orale, nasale und rek-
tale Impfung von Mäusen mit inakti-
vierten *S. typhi* murium-Bakterien mit
und ohne Dimethylsulfoxid-Zugabe
Inaug. Diss. FU Berlin 1968
100. Shiga, K. Über die aktive Immunisierung per os
Saikingaku-Zassi 139 (1908)
Zbl. Bakt. I. Abt. Ref. 42, 419 (1909)
101. Soletta, L. Ricerche sperimentale sulla vaccinazione
C. Grossi antidissenterica con speciale riguardo
all'immunità locale
Igiene mod. 1938, 49-63
Zbl. Bakt. I. Abt. Ref. 130, 343 (1938)

102. Ssadow, A.A. Über die Herstellung von alkoholischen Vaccinen für Immunisierung per os
7. Allrussischer Bakt. u. Epid. Kongreß
Moskau 1923
Zbl. Bakt. I. Abt. Ref. 76, 3 (1924)
103. Stellmacher, W. Die Schluckimpfung in der Veterinärmedizin
W. Müller
Mh. Vet. Med. 20, 370-374 (1965)
104. Strey, A. Untersuchungen zum Immunmechanismus
K. Lusky bei der oralen Vakzination mit Totantigen
W. Stellmacher 2. Mitteilung
H. Trolldenier Arch. exp. Vet. Med. 26, 291 (1972)
105. Tchitchkine, G. Essai d'immunisation par le voie gastrointestinale contre la toxine botulique
Ann. Inst. Pasteur 19, 335-345 (1905)
106. Thilo, W. Zur oralen Immunisierung von Mäusen
A. Weisler mit Shigella sonnei-Antigenen
J. Hyg. Epidem. (Praha) 14, 294 (1970)
107. Torikata, R. Experimentelle Erforschung über die Immunisierung des Darmtraktes
M. Shakudo Z. Immun. Forsch. 88, 227-240 (1936)
108. Veronesi, R. A new outlook on the prophylaxis of tetanus: immunization by the digestive route
A. Correa
J. Tavares Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo 27, 123 (1972)

109. Vladoianu, I.R. Laboratory tests on the effectiveness
 G. Dimache of oral vaccination of young child-
 S. Antohi ren against typhoid and paratyphoid
 O. Zarma A and B
 Bull. Wld. Hlth. Org. 32, 37-45 (1965)
110. Waldman, R.H. Oral immunization of mice with killed
 R. Grünspan Salmonella typhimurium vaccine
 R. Ganguly Inf. Imm. 6, 58-61 (1972)
111. Welikanow, I.M. Experimentelle Vaccination gegen den
 Botulismus
 Z. Immun. Forsch. 70, 186 (1931)
112. —. — World Health Organization Technical
 Report Series Nr. 500: Oral Enteric
 Bacterial Vaccines
 Geneva 1972
113. —. — Vaccination by the Non-Parenteral Route
 14. Congr. of Int. Ass. of Biol. Stand.
 Douglas, 21.-26.9.1975

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und für wertvolle Hinweise danken.

Besonders herzlich danke ich Herrn Dr. G. Baljer für die jederzeit gewährte hilfreiche Unterstützung.

LEBENS LAUF

Am 18. Dezember 1948 wurde ich als Sohn von Court Meiler und seiner Ehefrau Babette, geb. Hofmann, in Lippertsgrün geboren.

Nach 4 Volksschuljahren trat ich im September 1959 in das Schillergymnasium Hof/Saale über und bestand hier 1968 die Reifeprüfung.

Anschließend folgte der 18monatige Wehrdienst in Bad Reichenhall.

Im Sommersemester 1970 begann ich an der Universität München mit dem Studium der Tiermedizin. Dieses schloß ich im Frühjahr 1975 mit dem Staatsexamen ab.

